

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY DOCUMENT**

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **07 AVR. 1998**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **09 AVR 1997**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **97 04356 -**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **H**  
DATE DE DÉPÔT **9.4.97**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET LAVOIX**  
**2 Place d'Estienne d'Orves**  
**75441 PARIS CEDEX 09**

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
**REF 97/0173 53-20-14-20**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Peptides synthétiques utilisables dans les essais biologiques pour la détection des infections dues aux virus VIH 1 groupe O.**

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS**

Forme juridique

Nationalité (s)

**Française**

Pays

Adresse (s) complète (s)

**3, Boulevard Raymond Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE**

**FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

nature de la demande

pays d'origine

numéro

date de dépôt

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

**CABINET LAVOIX**

**M. MONCHENY n° 92.1179**

*N. Moncheny*

SIGNATURE DU PRÉPOSE À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'un des inventeurs)

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

2309, rue de Saint-Petersbourg  
75300 Paris Cedex 13  
Tél. 01 63 04 53 04 - Téléfax 01 43 93 59 30

N° D'ÉPREUVES INTERNATIONALES

97 04 356

### TITRE DE L'INVENTION :

**Peptides synthétiques utilisables dans les essais biologiques pour la détection des infections dues aux virus VIH 1 groupe 0.**

### LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS**

**3, Boulevard Raymond Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE FRANCE**

### DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

**CHENEBAUX Denis, Marie, Bernard**  
**34 Boulevard de Glatigny**  
**78000 VERSAILLES FRANCE**

**DELAGNEAU Jean-François, Hubert**  
**60 Avenue des Gressets**  
**78170 LA CELLE SAINT-CLOUD FRANCE**

**GADELLE Stéphane, Jean, Xavier**  
**Chemin de la Pature**  
**91570 BIEVRES FRANCE**

**RIEUNIER François, Yves**  
**6 chemin des Gravières**  
**78330 FONTENAY LE FLEURY FRANCE**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

**Paris, le 14 Mai 1997**

**CABINET LAVOIX**  
**M. MONCHENY n° 92.1179**

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
22			X	28.07.92	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

L'invention concerne des peptides synthétiques utilisables dans les essais biologiques pour la détection des infections dues aux virus VIH-1 groupe O, leur procédé de préparation, des compositions et des troussees contenant de tels peptides ainsi que les essais biologiques mettant en oeuvre de tels peptides.

5

Des rétrovirus VIH-1 du groupe O sont connus dans l'art antérieur. Le brevet EP 0 345 375 et la demande de brevet EP 0 657 532 décrivent les isolats ANT 70 et ANT 70 NA isolés chez des malades Camerounais. Ces documents décrivent plus précisément des antigènes et des compositions antigéniques contenant des lysats ou des protéines de ces isolats, les acides nucléiques correspondant à l'ARN génomique, des méthodes d'hybridation mettant en oeuvre ces acides nucléiques, des méthodes de production des isolats dénommés ci-dessus ainsi que des procédés de préparation de protéines p12, p16, p25, gp41 gp120 de ces rétrovirus.

10

La demande EP 0 591 914 décrit l'isolat MVP 5180/91. Cet isolat caractérisé par Western Blot présente, comme l'isolat précédent, des différences par rapport aux isolats du rétrovirus VIH-1, connus depuis longtemps. La demande EP 0 591 914 décrit précisément la séquence d'ADN de l'isolat MVP 5180/91 et indique précisément la localisation des gènes gag, pol et env. La demande EP 0 591 914 décrit encore des peptides synthétiques de la boucle V3 ainsi que de la région immunodominante gp41. Ces derniers sont utiles pour des essais biologiques, notamment pour la détection, *in vitro*, des anticorps VIH-1 groupe O.

15

20

La demande EP 0 673 948 décrit des peptides synthétiques ou recombinés constitués de 15 à 50 acides aminés (AA) et comportant la séquence -VWGIRQLRRLQALETLIQNQQRLNLWGXXKGKLIXYTSVKWNTSWSGR- dans laquelle X représente soit un résidu cystéine, soit un résidu serine. Ces peptides sont utiles dans le domaine diagnostique pour la détection des infections dues à certains isolats de rétrovirus VIH-1 groupe O.

25

30

On connaît également la demande EP 0 727 483 qui décrit l'isolat MVP 2901/94 qui fait aussi partie des rétrovirus appartenant à la famille VIH-1 groupe O. Cette demande décrit certains antigènes ayant des séquences peptidiques bien déterminées. Ces séquences peptidiques correspondent à une partie de la séquence de la gp120 de l'isolat MVP 2901/94.

35

La demande WO 96/12809 décrit deux isolats appartenant à la famille VIH-1 groupe O. Il s'agit des isolats VAU et DUR. Cette demande décrit certaines séquences peptidiques issues des deux virus cités ci-dessus, utiles pour la

détection d'anticorps reconnaissant les séquences peptidiques VIH-1 VAU ou DUR.

La demande WO 96/32293 décrit deux antigènes issus de la séquence de l'isolat ANT 70. Il s'agit de l'antigène appelé MDL061 et de l'antigène MDL056, de la région immunodominante de la gp41. Selon cette invention décrite dans la demande WO96/32293, pour détecter 100% des échantillons des sérums de malades infectés de VIH groupe O, il est nécessaire d'utiliser des compositions contenant ces deux peptides, puisque chaque peptide isolé ne permet pas à lui seul d'obtenir des résultats satisfaisants.

En effet, il est connu, que même lorsque l'on utilise des réactifs sérologiques issus des isolats du groupe O, il n'est pas souvent possible de dépister tous les malades infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O ; cela signifie qu'il n'est pas possible d'obtenir des réactifs qui garantissent 100% de sensibilité. Le groupe O soulève ainsi pour la première fois un problème important ; il s'agit de l'inadéquation de certains réactifs sérologiques quant à reconnaître des individus contaminés par des groupes ou sous-types particulièrement divergents. C'est le cas justement du VIH groupe O.

La demande WO 96/40763 insiste aussi sur la grande divergence du groupe O. Cette demande décrit des peptides qui incorporent dans une séquence naturelle VIH-1 de type B, quelques petites modifications (remplacement de un ou deux acides aminés). Selon cette demande, ces peptides hybrides sont capables de réagir avec des anticorps anti groupe O.

De manière inattendue il a été maintenant trouvé, que certains peptides synthétiques, qui ne correspondent pas à une séquence naturelle, sont d'excellents réactifs diagnostiques et permettent de dépister de manière satisfaisante les malades infectés par les rétrovirus VIH-1 du groupe O. Ces peptides « artificiels » sont composés de séquences variables articulées autour de courtes séquences très conservées, présentes dans les isolats des rétrovirus VIH-1 du groupe O. Les peptides de l'invention permettent d'obtenir des résultats beaucoup plus performants que ceux obtenus avec des peptides synthétiques dont la séquence correspond à une partie de la séquence de l'enveloppe (env) de certains isolats VIH-1 du groupe O et qui contiennent des épitopes immunodominants de la gp41.

Par la suite, pour dénommer les acides aminés sera utilisée la nomenclature à trois lettres.

Les peptides synthétiques de l'invention comportent de 20 à 50 acides aminés et répondent à la formule générale I :



dans laquelle :

- $\Delta$  représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome d'hydrogène, un radical acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO-}$ ), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone,

- Z représente un radical de formule II à X :

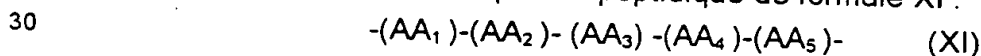
15	$\Xi_1\text{-Ser-}\Xi_2$	(II)
	$\text{-Ser-}\Xi_2$	(III)
	$\text{-}\Xi_1\text{-Ser}$	(IV)
	$\Xi_1\text{-Gln-}\Xi_2$	(V)
	$\text{-Gln-}\Xi_2$	(VI)
20	$\Xi_1\text{-Gln-}$	(VII)
	$\Xi_1\text{-Asn-}\Xi_2$	(VIII)
	$\text{-Asn-}\Xi_2$	(IX)
	$\text{-}\Xi_1\text{-Asn}$	(X)

25 dans lesquelles :

$\text{-}\Xi_1$  représente une séquence peptidique de 1 à 5 acides aminés et

$\text{-}\Xi_2$  un acide aminé,

$\text{-}\Theta$  représente une séquence peptidique de formule XI :



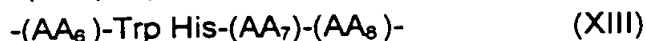
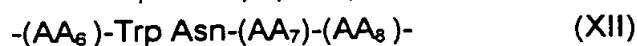
dans laquelle :

- ( $\text{AA}_1$ ) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- ( $\text{AA}_2$ ) représente soit un résidu glycine, soit un résidu asparagine,
- ( $\text{AA}_3$ ) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- ( $\text{AA}_4$ ) représente soit un résidu leucine, soit un résidu alanine, soit un résidu isoleucine, soit un résidu glutamine,



- (AA<sub>5</sub>) représente soit un résidu isoleucine, soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine, soit un résidu norleucine, soit un résidu norvaline, à condition toutefois que (AA<sub>1</sub>), (AA<sub>2</sub>), (AA<sub>3</sub>), (AA<sub>4</sub>) et (AA<sub>5</sub>) ne forment pas ensemble les séquences peptidiques -Lys Gly Lys Leu Ile- et -Lys Gly Lys Leu Val-,

-Σ représente une séquence peptidique de formule XII ou de formule XIII :



dans lesquelles :

- (AA<sub>6</sub>) représente un acide aminé différent de la lysine,
- (AA<sub>7</sub>) représente un acide aminé,
- (AA<sub>8</sub>) représente un résidu serine ou thréonine,

-Ψ, fixé sur le reste -CO- de l'acide aminé AA<sub>8</sub> libre, représente un groupe OH, un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone, ou le reste d'un peptide Ω, de formule :



avec Z, θ, Σ sont tels que définis ci-dessus, et

-ψ' représente un groupe OH ou radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone.

Dans le cas où Ψ forme une liaison peptidique entre le reste -CO- de l'acide aminé AA<sub>8</sub> et Ω, le peptide de formule I est donc un dimère.

Les peptides selon l'invention peuvent être, soit sous forme linéaire, soit sous forme cyclisée par l'intermédiaire de ponts disulfure des cystéines.

Les peptides selon l'invention peuvent être liés à une phase solide, notamment par leur extrémité N-terminale.

On préfère les peptides de formule I dans laquelle :

- Δ représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome d'hydrogène, un radical acétyle (CH<sub>3</sub>CO-), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone,

-Z représente une séquence peptidique de formule



ou



-Θ représente une séquence peptidique de formule

-Arg Gly Lys Ala Val-,

-Arg Gly Arg Leu Val-,

-Lys Gly Arg Leu Val-

5 ou

-Arg Gly Arg Ala Val-

et Σ représente une séquence peptidique de formule

-Gln Trp Asn Glu Thr-

ou

10

-Gln Trp Asn Ser Thr-

On préfère tout peptide incluant l'une des séquences suivantes et comportant de 22 à 50 acides aminés. Ces séquences sont données selon les nomenclatures à une et à trois lettres :

15

séquence N° 1

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

20

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

séquence N° 2

25

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

30

22

séquence N° 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

ou

35

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

séquence N° 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

5 -Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20  
 Ser Thr-  
 22

10 séquence N° 5

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20  
 15 Ser Thr-  
 22

séquence N° 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

20 ou

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20  
 Glu Thr-  
 22

25

séquence N° 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 30 1 5 10 15 20  
 Glu Thr-  
 22

35 Les peptides synthétiques ci-après sont des peptides particulièrement  
 préférés.

PEPTIDE N° 1

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

5

22

PEPTIDE N° 2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

10

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

15

PEPTIDE N° 3

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

20

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

PEPTIDE N° 4

25 LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Ser Thr

30

22

PEPTIDE N° 5

LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

35 Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Ser Thr

22

PEPTIDE N° 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

5            1                            5                            10                            15                            20

Glu Thr

22

PEPTIDE N° 7

10 LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                            5                            10                            15                            20

Glu Thr

15            22

Les peptides synthétiques de formule I, objet de la présente invention, peuvent être obtenus par synthèse en phase solide selon des méthodes classiques R.B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* (1963), 85, pp. 2149-2154 ;

20 R.C. Sheppard, in « *Peptides 1971* », Nesvadba H (ed.) North Holland, Amsterdam, pp. 111 ; E. Atherton and R.L. Sheppard, in « *Solid phase peptide synthesis, a practical approach* », IRL PRESS, (1989), Oxford University Press, pp. 25-34. Comme synthétiseur automatique on peut utiliser le synthétiseur « 9050 Plus Pep Synthesizer » de Millipore ou un synthétiseur équivalent.

25

Le support solide, utilisé pour les synthèses, doit être compatible avec la technique et la chimie utilisée. Par exemple, pour une synthèse sur le synthétiseur « 9050 Plus pep. Synthesizer », il est recommandé d'utiliser une résine adaptée à la technique dite « en flux continu » ; les résines PEG PS répondent à ces

30 critères. Ces supports sont constitués d'un bras (« spacer ») à base de polyéthylèneglycol (PEG) situé entre le groupement fonctionnel du polystyrène des billes et le point d'accrochage du premier acide aminé. La nature de ce point d'ancrage peut varier selon la fonction C-terminale choisie. La résine PEG-PS est utilisée de préférence pour la synthèse des peptides selon l'invention.

35

La résine de départ et les acides aminés utilisés comme matière première sont des produits disponibles dans le commerce (PerSeptive-Biosystem, ou Néosystem).

Pour la synthèse peptidique, les groupements protecteurs de chaînes latérales suivants ont été utilisés :

Acides aminés	Groupe protecteur
Arginine	Pentaméthyl-2,2,4,6,7-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)
Asparagine, Glutamine	Trityle (Trt)
Cystéine	Trityle (Trt) ou Acétamidométhyle (Acm)
Sérine, Thréonine, Tyrosine	Ether tert-butyle (tBu)
Lysine, Tryptophane	Tert-butyloxycarbonyl (Boc)

5 La protection temporaire de la fonction amine primaire en  $\alpha$  des acides aminés a été effectuée à l'aide du groupement 9-fluorénylméthoxyloxycarbonyl (Fmoc). La déprotection est effectuée par une solution de pipéridine à 20% dans le diméthylformamide.

Pour le couplage, on utilise de préférence un excès de diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) et d'hydroxy-1-benzotriazole (HOBt).

Après synthèse, la résine est lavée avec des solvants organiques, (diméthylformamide, puis dichlorométhane) séchée sous vide puis traitée par une solution à base d'acide trifluoroacétique (TFA) refroidie à 0°C et contenant des inhibiteurs ou agents purificateurs « scavengers » appropriés. On peut utiliser, par exemple, le réactif K contenant 82% d'acide trifluoroacétique, 5% de phénol, 5% d'eau, 5% de thioanisole et 3% d'éthanedithiol.

Les peptides synthétiques ainsi isolés sont ensuite précipités et rincés à l'éther.

Les peptides synthétiques sont ensuite purifiés par chromatographie liquide en phase inverse et leur pureté est déterminée par spectrométrie de masse. Comme phase solide, on peut utiliser, par exemple, la phase Bondapack C-18. Les peptides sont élués en réalisant un gradient linéaire entre deux solutions tampons, le premier essentiellement aqueux (par exemple eau-TFA 0,1 %) et le second plutôt organique (par exemple un mélange contenant d'acétonitrile 60 %, eau 39,92 % et TFA 0,08 %). Les fractions pures collectées sont rassemblées, concentrées sous vide et lyophilisées.

Pour la cyclisation, les peptides synthétiques purifiés sont dissous dans une solution d'acétate d'ammonium (10mM). Le pH est ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque 1 M. La solution est vigoureusement agitée. La cyclisation est complète après 18 heures. Le pH est ensuite abaissé à 6 par addition d'acide

acétique. Les peptides cyclisés sont lyophilisés, puis purifiés par chromatographie liquide en phase inverse comme décrit précédemment.

5 L'immunoréactivité des peptides de l'invention a été évaluée à l'aide de sérums de malades camerounais infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O. Les différents essais effectués ont démontré que les peptides de l'invention seuls ou en association (compositions de peptides), permettent de détecter 100% des sérums infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O.

10 Les peptides synthétiques de l'invention trouvent donc leur application dans les tests immunologiques pour le dépistage des infections dues aux rétrovirus VIH-1 groupe O. Il est également possible d'utiliser des associations de plusieurs peptides synthétiques de formule I. Ces associations, qui peuvent contenir deux ou plusieurs peptides de formule I, font aussi partie de l'invention. On préfère des  
15 associations des peptides N°1 et N°3.

Il est aussi possible d'envisager des associations contenant de peptides synthétiques de formule I de la présente invention avec des peptides recombinés VIH-1 groupe O tels qu'ils peuvent obtenus par des méthodes classiques et ayant  
20 utilisant les séquences décrites dans EP 0 591 914. De telles associations entrent aussi dans le cadre de la présente invention.

Les peptides synthétiques de l'invention peuvent être aussi utilisés en association avec d'autres peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 et/ou VIH-2, tels que, par exemple, les peptides décrits dans les demandes de brevets ou  
25 brevets EP 0 387 914, EP 0 239 425, EP 0 220 273, EP 267 802 e.t.c. Cette liste de demandes de brevets ou brevets n'est pas exhaustive et est donnée, comme mentionné précédemment, à titre d'exemple.

Les compositions contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I et un ou plusieurs synthétiques ou recombinés VIH-1 ou VIH-2 trouvent  
30 leur application dans le diagnostic pour le dépistage de malades infectés par différents rétrovirus VIH. Ces compositions font également partie de la présente invention.

Des procédés d'immunodosage utilisant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I, seuls ou en association avec des peptides recombinés  
35 VIH-1 groupe O ou des peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 et/ou VIH-2, font également partie de l'invention.

L'invention vise également des trousse, pour la mise en oeuvre d'immunodosages, qui incluent un peptide de formule I ou une composition qui contient au moins un peptide de formule I.

- 5 Les exemples suivants illustrent l'invention et sont donnés à titre non limitatif.

### EXEMPLE 1 :

#### 10 Préparation d'un composé selon l'invention ; PEPTIDE N° 2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

15 1 5 10 15 20  
Glu Thr  
22

20 Ce peptide a été synthétisé en phase solide. La technique mise au point en 1963 par Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85, pp. 2149-2154) consiste à fixer le premier acide aminé sur un support solide polymérique (résine) par sa fonction acide et à allonger la séquence peptidique à partir de ce premier acide aminé, le peptide en cours de synthèse restant ancré sur la résine.

25 Pour la synthèse du peptide N° 2, ont été utilisés, comme synthétiseur, le synthétiseur « 9050 Plus Pep Synthetiser » et comme résine, la résine Fmoc Thr (OtBu) PEG PS.

Les différentes étapes de la synthèse sont résumées dans le tableau I ci-après



Tableau I

RESIDU ACIDE AMINE	PROTECTION NH <sub>2</sub>	PROTECTION LATERALE	METHODE DE COUPLAGE	NOMBRE D'EQ - DUREE DE COUPLAGE
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min

5

Après la fin de la synthèse, la résine a été lavée avec du diméthylformamide, puis du dichlorométhane et séchée sous vide.

10 Ensuite, la résine a été traitée avec du réactif K (acide trifluoacétique 82 % ; phénol 5 % ; eau 5 % ; thioanisole 5 % ; éthanedithiol 3 %). Le peptide N° 2, isolé par précipitation à l'aide de diéthyle oxyde, a été ensuite rincé avec le même solvant. On a ainsi obtenu 140 mg du peptide N° 2.

Le peptide N° 2 a été ensuite purifié par chromatographie liquide en phase inverse. Comme phase solide, il a été utilisé la phase Bondapack C-18. Le peptide a été élué en réalisant un gradient linéaire entre deux solutions tampons, le premier essentiellement aqueux (par exemple eau-TFA 0,1 %) et le second plutôt organique (par exemple un mélange contenant : l'acétonitrile 60 %, eau 39,92 % et TFA 0,08 %). Les fractions pures collectées ont été rassemblées, concentrées sous vide et lyophilisées.

Pour la cyclisation, le peptide synthétique purifié, ainsi obtenu a été dissous dans une solution d'acétate d'ammonium (10mM). Le pH a été ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque 1 M. La solution a été vigoureusement agitée. La cyclisation a été complète après 18 heures. Le pH a été ensuite abaissé à 6 par addition d'acide acétique. Le peptide cyclisé a été lyophilisé, puis purifié chromatographie liquide en phase inverse comme décrit précédemment.

De manière équivalente, et en utilisant les acides aminés appropriés, ont été synthétisés les autres composés de l'invention.

Le tableau II indique le poids moléculaire de certains peptides de formule I, sous forme non cyclisée, évalué par spectrométrie de masse.

Tableau II

Peptide	Poids moléculaire (Dalton)
1	PM 2512
2	PM 2583
3	PM 2528
4	PM 2586
5	PM 2527

**EXEMPLE 2 :****Evaluation de l'immun réactivité des peptides selon l'invention par t st immuno-enzymatique.**

5 Les sérums utilisés ESS, DUR, VAU et HAD sont des sérums de malades français infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O. Les autres échantillons de sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O ont été obtenus par le Centre Pasteur de Yaoundé au Cameroun et ont été serotypés groupe O selon l'algorithme sérologique décrit dans *AIDS (1977), 11, pp 445-453*.

10 Les sérums VIH négatifs (n=48) ont été obtenus à partir de volontaires sains.

15 Les peptides synthétiques utilisés ont été dissous dans l'eau à une concentration de 1 mg/ml (solution mère). Pour l'étape de recouvrement (coating), 110 µl d'une solution à 2 µg/ml de chaque peptide (obtenue par dilution de la solution mère avec de la solution tampon carbonate 0,1 M) ont été ajoutés à chaque cupule des plaques de microtitrage Microtiter™ (NUNC). Après incubation pendant une nuit à température ambiante, les microplaques ont été d'abord lavées  
20 avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium 0,001%, puis saturées avec une solution de PBS contenant 0,5% de Régilait™ (lait écrémé desséché). Après aspiration de la solution de saturation, les plaques ont été chauffées pendant 10 min à 50°C.

25 Les échantillons de sérums ont été dilués au 1/5 avec une solution de lait écrémé (tampon citrate additionné de 0,01% de rouge de phénol, de chloroforme à 0,25% et de Kathon 0,25%), déposés sur les cupules des plaques et incubés pendant 30 min à 40°C.

30 Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium 0,001%, 100 µl d'une solution de conjugué anticorps de chèvre anti IgG et IgM humaines marqués à la peroxydase de raifort, contenant comme conservateur 0,01% de merthiolate de sodium, en solution dans une solution tampon citrate additionné de glycérol à 30% et du  
35 sérum normal de veau foetal à 25% ont été ajoutés à chaque cupule de plaques puis ces dernières ont été incubées pendant 30 min à 40°C.

Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium 0,001%, le développement de la

coloration a été obtenu par addition dans chaque cupule de 100 µl de O-phenylène diamine en solution dans du peroxyde d'hydrogène. Les microplaques ont été ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante et dans l'obscurité. La réaction colorée a ensuite été arrêtée par addition de 100 µl d'acide sulfurique 4N. L'absorbance (A) a été déterminée à 490 et 620 nm.

L'intensité relative (A490-A620) lue dans chaque cupule est proportionnelle à l'immunoréactivité de chaque peptide. Cela indique l'aptitude de chaque peptide à réagir avec l'échantillon biologique avec lequel est effectué l'essai. La valeur seuil (cut-off) a été déterminée comme étant une absorbance égale à 0.15. Elle correspond à la moyenne de valeurs négatives (n=48) plus 12 écart-types.

La réactivité des peptides de l'invention, (peptide N° 3, peptide N° 2 et peptide N° 1 tous sous forme cyclisée) a été comparée à celle de deux peptides synthétiques ayant comme séquence une partie de la séquence naturelle de l'enveloppe (env) de l'isolat VAU (rétrovirus VIH-1 groupe O) et comportant un épitope immunodominant de gp41.

Ces deux peptides, sous forme cyclisée, ont la séquence suivante :

#### VAU 22 AA

Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn  
1 5 10 15 20

Lys Thr

22

#### VAU 35 AA

Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Phe Ile Glu Glu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys  
1 5 10 15 20

Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Lys Thr  
25 30 35

Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau III.

Tableau III

SERUM	ABSORBANCE				
	PEPTIDE N° 3	PEPTIDE N° 2	PEPTIDE N° 1	VAU 22 AA	VAU 35 AA
ESS**	>***	>	2,494	>	>
DUR**	>	>	>	0,118	0,872
HAD	>	0,518	0,041	0,789	0,871
VAU**	1,342	>	>	>	>
3935*	>	0,893	0,307	0,138	0,227
6891	>	0,614	0,062	0,359	0,496
6512**	0,746	0,785	>	0,120	0,174
1105**	1,421	1,031	>	0,099	0,129
4021**	0,430	0,119	>	0,050	1,957
5969**	>	0,282	>	2,491	>
2700	>	0,274	>	>	>
5453	0,555	0,081	>	1,267	1,482
5931*	>	>	>	0,202	2,225
3136*	>	0,992	0,302	>	>
3653	1,352	>	0,044	1,441	1,322
2352	>	>	0,205	>	>
3016	>	>	0,243	>	>
3302	>	>	0,386	>	>
2294	>	>	0,447	>	>
3771	>	>	0,544	>	>
1581	>	>	>	1,112	0,894
5373	>	>	>	1,359	0,856
7443	>	>	>	0,920	0,574
3637*	>	>	>	0,779	1,647
6295**	1,718	1,063	>	0,972	>
6689**	0,710	>	>	>	>
1754	>	>	>	1,263	1,948
4489**	>	>	>	1,318	1,718
4364*	>	>	1,382	>	>
3884**	>	>	1,839	>	>
3529	>	>	1,803	>	>
3482	2,402	>	1,473	>	>
1702	>	>	1,162	>	>
6487*	>	1,017	2,687	2,889	2,891
5164*	>	>	>	>	>
5766**	>	>	>	>	>
3945*	>	>	>	>	>

\* sérotypés

5 \*\* sérotypés / génotypés

\*\*\* &gt; = signal supérieur à la capacité de lecture de spectrophotomètre.

Tableau III (suite)

SERUM	ABSORBANCE				
	PEPTIDE N° 3	PEPTIDE N° 2	PEPTIDE N° 1	VAU-22 AA	VAU 35 AA
4434*	>	OVER	>	2,273	>
4288**	>	>	2,802	2,337	N.T.****
6782	>	2,091	2,462	2,190	2,214
2313	>	>	>	>	>
2312	>	>	>	>	>
1062	>	>	>	>	>
402	>	>	>	>	>
134	>	>	>	>	>
7120	>	>	>	>	>
7212	>	>	>	>	>
6976**	>	>	>	>	>
3600**	>	>	2,743	>	>
3236	>	>	>	>	>
3235	>	>	>	>	>
2551	>	>	>	>	>
5270**	>	>	>	>	>
5210	>	>	>	>	>
5149**	>	>	>	>	>
4477	>	>	>	2,511	>
3891	>	>	2,780	>	>
3627**	>	>	2,910	>	>
7258**	>	>	2,477	>	>
7007	2,136	2,334	>	>	2,151
6697	>	>	>	>	>
6998	>	>	>	>	>
6627	>	>	>	>	>
6198*	>	>	>	>	>
6165	>	>	2,714	>	>
7439	>	>	>	>	>
7297**	>	>	>	>	>
6111	>	>	>	>	>
625	>	>	>	>	2,885

\* sérotypés

5 \*\* sérotypés / génotypés

\*\*\* &gt; = signal supérieur à la capacité de lecture de spectrophotomètre.

\*\*\*\* Non testé

10 Les résultats du tableau III démontrent que le peptide N° 3 donne les meilleures performances de tous les autres peptides. Ce peptide permet la meilleure discrimination de sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1

groupe O par rapport aux deux peptides ayant une partie de la séquence de l'isolat VAU correspondant à l'épitope immunodominant de gp41. Par ailleurs, les peptides N° 2 et N° 1 de l'invention sont plus immunoréactifs par rapport au peptide VAU 22 AA qui comporte le même nombre d'acides aminés.

5

### EXEMPLE 3 :

#### Evaluation de l'immunoréactivité des compositions contenant d s peptides selon l'invention par test immuno-enzymatique.

10 Pour cet essai, il a été procédé selon le protocole décrit dans l'exemple 2 et les mêmes sérums ont été utilisés. Les microplaques utilisées ont été recouvertes soit avec le peptide N° 1 cyclisé, soit avec le peptide N° 3 cyclisé, soit avec une composition contenant ces deux peptides (1:1 p/p). Dans chaque cupule ont été déposés, soit 100 µl d'une solution contenant 2 µg/ml de peptide N° 1, soit 100 µl  
15 d'une solution contenant 2 µg/ml de peptide N° 3, soit 100 µl d'une solution contenant 1 µg/ml de peptide N° 1 et 1 µg/ml de peptide N° 3.

Les résultats de cet essai sont donnés dans le tableau IV.

Tableau IV

20

SÉRUM	ABSORBANCE		
	PEPTIDE N° 1 ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 3 ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 1 ( 1µg/ml ) + PEPTIDE N° 3 ( 1 µg /ml )
3529	1,803	>*	>
1105	>	1,421	>
3891	2,780	>	>
3235	>	>	>
2700	>	>	>
5931	>	>	>
3935	0,307	>	>
7443	>	>	>
1062	>	>	>
1754	>	>	>
3136	0,302	>	>
6891	0,062	>	>
5149	>	>	>
5270	>	>	>
2551	>	>	>
3600	2,743	>	>
6976	>	>	>
4489	>	>	>
6165	2,714	>	>

\* > = signal supérieur à la capacité de lecture de spectrophotomètre.

Tableau IV (suite)

SERUM	ABSORBANCE		
	PEPTIDE N° 1 ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 3 ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 1 ( 1µg/ml ) + PEPTIDE N° 3 ( 1 µg /ml )
6198	>*	>	>
6627	>	>	>
6998	>	>	>
6697	>	>	>
7258	2,477	>	>
3627	2,910	>	>
4477	>	>	>
3771	0,544	>	>
1702	1,016	>	>
2294	0,447	>	>
2352	0,205	>	>
3016	0,243	>	>
3302	0,386	>	>
3482	1,473	>	>
3653	0,044	1,322	1,105
4364	1,382	>	>
3637	>	>	>
4288	2,802	>	>
5969	>	>	>
258	>	>	>
6111	>	>	>
625	>	>	>
6853	>	2,769	>
3136	0,302	>	>
6689	>	0,710	>
6295	>	1,718	>
4021	>	0,430	2,381
3884	1,839	>	>
6512	>	0,746	>
6487	2,687	>	>
ESS	2,494	>	>
HAD	0,041	>	>
DUR	>	>	>

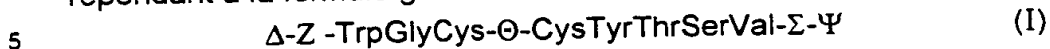
5 \* > = signal supérieur à la capacité de lecture de spectrophotomètre.

Les résultats du tableau IV démontrent que les compositions des peptides de l'invention, lorsque utilisées en diagnostic permettent la détection de tous les sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O.



### Revendications

1. Peptides synthétiques comportant de 20 à 50 acides aminés et répondant à la formule générale I :



dans laquelle :

10 - $\Delta$  représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome d'hydrogène, un radical acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ ), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone,

- Z représente un radical de formule II à X :

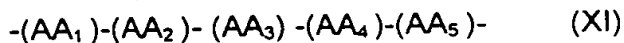
	$\Xi_1$ -Ser- $\Xi_2$	(II)
15	-Ser- $\Xi_2$	(III)
	- $\Xi_1$ -Ser	(IV)
	$\Xi_1$ -Gln- $\Xi_2$	(V)
	-Gln- $\Xi_2$	(VI)
	$\Xi_1$ -Gln-	(VII)
20	$\Xi_1$ -Asn- $\Xi_2$	(VIII)
	-Asn- $\Xi_2$	(IX)
	- $\Xi_1$ -Asn	(X)

dans lesquelles :

25 - $\Xi_1$  représente une séquence peptidique de 1 à 5 acides aminés et

- $\Xi_2$  un acide aminé,

- $\Theta$  représente une séquence peptidique de formule XI :

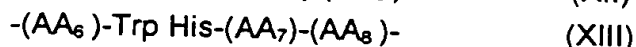
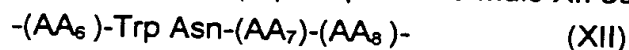


30 dans laquelle :

- ( $\text{AA}_1$ ) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- ( $\text{AA}_2$ ) représente soit un résidu glycine, soit un résidu asparagine,
- ( $\text{AA}_3$ ) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- 35 • ( $\text{AA}_4$ ) représente soit un résidu leucine, soit un résidu alanine, soit un résidu isoleucine, soit un résidu glutamine,

- (AA<sub>5</sub>) représente soit un résidu isoleucine, soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine, soit un résidu norleucine, soit un résidu norvaline, à condition toutefois que (AA<sub>1</sub>), (AA<sub>2</sub>), (AA<sub>3</sub>), (AA<sub>4</sub>) et (AA<sub>5</sub>) ne forment pas ensemble les séquences peptidiques -Lys Gly Lys Leu Ile- et -Lys Gly Lys Leu Val-,

-Σ représente une séquence peptidique de formule XII ou de formule XIII :



dans lesquelles :

- (AA<sub>6</sub>) représente un acide aminé différent de la lysine,
- (AA<sub>7</sub>) représente un acide aminé,
- (AA<sub>8</sub>) représente un résidu serine ou thréonine,

-Ψ, fixé sur le reste -CO- de l'acide aminé AA<sub>8</sub> libre, représente un groupe OH, un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone, ou le reste d'un peptide Ω, de formule :



avec Z, Θ, Σ sont tels que définis ci-dessus, et

-ψ' représente un groupe OH ou radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone, sous forme linéaire ou sous forme cyclisée par l'intermédiaire de ponts disulfure des cystéines, et peptides de formule I liés à une phase solide.

25

2. Peptides synthétiques de formule I selon la revendication 1, dans laquelle :

-Δ représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome d'hydrogène, un radical acétyle (CH<sub>3</sub>CO-), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone,

-Z représente une séquence peptidique de formule



ou



-Θ représente une séquence peptidique de formule

-Arg Gly Lys Ala Val-,  
 -Arg Gly Arg Leu Val-,  
 -Lys Gly Arg Leu Val-

ou

5

-Arg Gly Arg Ala Val-

et  $\Sigma$  et  $\Psi$  forment ensemble une séquence peptidique de formule

-Gln Trp Asn Glu Thr-

ou

-Gln Trp Asn Ser Thr-

10

3. Peptides synthétiques de formule I selon la revendication 1 comportant de 22 à 50 acides aminés et incluant l'une des séquences suivantes :

SEQUENCE N° 1

15 -LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

20

22

SEQUENCE N° 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

25 -Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

30 SEQUENCE N° 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

35

Glu Thr-

22

SEQUENCE N° 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

5      1                      5                      10                      15                      20

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

Ser Thr-

22

SEQUENCE N° 5

10 -LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

15      1                      5                      10                      15                      20

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

Ser Thr-

22

SEQUENCE N° 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

20 ou

1                      5                      10                      15                      20

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

Glu Thr-

22

25

SEQUENCE N° 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

ou

30      1                      5                      10                      15                      20

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

Glu Thr-

22

35

4. Peptides synthétiques, selon la revendication 1, de séquence :

PEPTIDE N° 1

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr

22

5

PEPTIDE N° 2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 10 1 5 10 15 20

Glu Thr

22

PEPTIDE N° 3

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

15 ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr

22

20

PEPTIDE N° 4

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 25 1 5 10 15 20

Ser Thr

22

PEPTIDE N° 5

30 LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Ser Thr

35 22

PEPTIDE N° 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20  
 Glu Thr  
 22

5

PEPTIDE N° 7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 10 1 5 10 15 20  
 Glu Thr  
 22

15 5. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

20 6. Composition contenant le peptide N° 3 et le peptide N° 1 selon la revendication 4.

25 7. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I selon la revendication 1 et un ou plusieurs peptides recombinés VIH-1 groupe O.

30 8. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I, selon la revendication 1, et un ou plusieurs peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 et/ou VIH-2.

35

9. Procédé d'immunodosage mettant en oeuvre un ou plusieurs peptides synthétiques de formule I, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10. Procédé d'immunodosage mettant en oeuvre une composition selon l'une quelconque de revendications 5 à 8.

5

11. Trousse de diagnostic incluant au moins un peptide synthétique de formule I, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou une composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.

-Arg Gly Lys Ala Val-,  
 -Arg Gly Arg Leu Val-,  
 -Lys Gly Arg Leu Val-

ou

5

-Arg Gly Arg Ala Val-

et  $\Sigma$  représente une séquence peptidique de formule

-Gln Trp Asn Glu Thr-

ou

-Gln Trp Asn Ser Thr-

10

3. Peptides synthétiques de formule I selon la revendication 1 comportant de 22 à 50 acides aminés et incluant l'une des séquences suivantes :

SEQUENCE N° 1

15 -LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

20

22

SEQUENCE N° 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

25 -Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

30 SEQUENCE N° 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

35

Glu Thr-

22



100-100000-100000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**